Charakterisierung antibakterieller Aktivität in Kulturüberständen von Proteus rettgeri

Andreas Baumgarten

1981

Aus dem Max von Pettenkofer-Institut

der Universität München

Direktor Prof. Dr. F. Deinhardt

Charakterisierung antibakterieller Aktivität in Kulturüberständen von Proteus rettgeri

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin an der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Andreas Baumgarten
aus
München
1981

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. A. Bauernfeind

Mitberichterstatter: Prof. Dr. F. Deinhardt

Dekan: Prof. Dr. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 26.11.1981

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. A. Bauernfeind für die Überlassung des Themas und für die wertvolle und intensive Betreuung während der Entstehung der vorliegenden Arbeit.

Den Direktoren des Max von Pettenkofer-Instituts,
Herrn Prof. Dr. Dr. H. Eyer und
Herrn Prof. Dr. F. Deinhardt danke ich für die großzügigen Arbeitsmöglichkeiten, die mir am Institut zur Verfügung standen.

Besonders danken möchte ich auch Frau Chr. Petermüller und Fräulein J. Burrows für ihre Mühe, Geduld und Hilfsbereitschaft im Labor.

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41535726_0047

Inhalt

		Seite
I.	Einleitung	1
II.	Material und Methoden	2
	1. Material	2
	a) Stämme	2
	b) Medien, Reagenzien	3
	c) Geräte	5
	2. Methoden	
	a) Rettgerocinherstellung	6
	b) Rettgerocinnachweis	7
	c) Rettgerocinanreicherung durch Sedimentieren	8
	d) Diffusionstest	8
	e) Bestimmung des Sedimentationsverhaltens	9
	f) Nachweis von rettgerocininaktivierenden Substanzen	10
	g) Verfahren zur Charakterisierung der rettgerocininaktivierenden Substanzen	11
	aa) Ammoniumsulfatlösung	11
	bb) Trypsinbehandlung	11
	cc) Phenolextraktion	12
	dd) Behandlung mit Natriumdodecylsulfat (SDS)	12
	ee) Präzipitation mit Pt. rettgeri Anti-O-Serum	12
	ff) Antikörpernachweis im Agardiffusionstest nach Ouchterlony	12

Seite

III. Ergebnisse

1. Stabilität der Rettgerocine und untersuchten Phagen 13

2. Sedimentierbarkeit der untersuchten Hemmstoffe durch Ultrazentrifugation 16

3. Diffusionsfähigkeit 17

4. Bestimmung der Sedimentationskonstanten 19

a) Optimierung der Methode 19

b) Markerauswahl nach selektiven Indikatoren 21

c) Sedimentationskonstante von J5 und den anderen Markern 22

d) Lage der Peaks im Saccharosegradienten 22

e) Ergänzende Untersuchungen bei R4 22

5. Rettgerocininaktivatoren 24

a) Der von D3 gebildete Inaktivator 24

aa) Titer in unbehandeltem D3-Überstand 25

bb) Dialysierbarkeit 25

cc) Fällbarkeit durch Ammoniumsulfat 25

dd) Sedimentierbarkeit durch Ultrazentrifugation 25

ee) Filtrierbarkeit und Absorption an Filter 25

ff) pH-Stabilität von Inaktivator und Rettgerocin 25

gg) Trypsinempfindlichkeit 26

hh) Bildungskinetik des Inaktivators 26

ii) Behandlung mit SDS 27

jj) Phenolextraktion des Inaktivators 28

kk) Zentrifugation im Saccharosegradienten 28

ll) Nachweis von Inaktivator in verschiedenen Untersuchungsmaterialien 28

mm) Verhalten des Inaktivators im Immundiffusionstest 29

Tabellen und Abbildungen: Seite

Tab. 1: Rettgerocine: Producerstämme, Indikatoren, Stabilität 14

Tab. 2: Temperente Phagen: Producerstämme, Indikatoren, Stabilität 16

Tab. 3: Diffusionsvermögen der Hemmstoffe 18

Tab. 4: Sedimentationsverhalten der Rettgerocine 23

Tab. 5: Trypsinempfindlichkeit von Rettgerocin und Inaktivator 26

Tab. 6: Kinetik der Inaktivatorbildung 27

Tab. 7: SDS-Empfindlichkeit von Rettgerocin und Inaktivator 27

Tab. 8: Rettgerocininaktivatoren bei empfindlichen Stämmen 32

Tab. 9: Rettgerocininaktivatoren bei unempfindlichen Stämmen 32

Abb. 1: Immundiffusion von Rettgerocin und Inaktivator gegen Anti-Rettgerocinserum und Anti-O-Serum 29

Seite

nn) Ausfällung durch D3-Anti-O-Serum 30

oo) Bindungsstärke zwischen Inaktivator, Rettgerocin und Antikörper 30

pp) Kinetik der Inaktivierung 30

qq) Wirkungsspektrum des Inaktivators von D3 30

b) Inaktivatoren bei anderen untersuchten Stämmen 31

aa) Vorkommen des Inaktivators D3 31

bb) Inaktivatoren bei Rettgerocin-empfindlichen Stämmen 31

cc) Inaktivatoren bei Rettgerocin-unempfindlichen Stämmen 32

IV. Diskussion

1. Stabilität der Hemmsubstanzen 33

2. Diffusion der Hemmsubstanzen 34

3. Sedimentationskonstanten und Molekulargewichte 36

4. Eigenschaften der Rettgerocininaktivatoren 38

a) Bildung 38

b) Physikalische und chemische Charakterisierung 39

c) Serologische Charakterisierung 39

d) Biologische Charakterisierung 40

e) Wirkungsweise des Inaktivators 41

f) Inaktivatoren gegen Bacteriocine anderer Arten 41

V. Zusammenfassung 43

VI. Schrifttum 44

I. Einleitung

In kausalem und zeitlichem Zusammenhang mit einem Krankenhausaufenthalt treten bei 2 bis 6 % aller hospitalisierten Patienten Infektionen auf.[6] Die Erreger dieser Infektionen stammen entweder aus dem endogenen Keimreservoir des Patienten oder aus dem Klinikmilieu. Der exogene Anteil dieser nosokomialen Infektionen ist am ehesten durch hygienische Maßnahmen reduzierbar.

Über seine Größe und damit über den Grad der Reduzierbarkeit von Hospitalinfektionen liegen bisher für gramnegative Erreger keine exakten Analysen vor. Grund dafür ist der Mangel an brauchbaren Methoden, mit denen die Identität von Bakteriensiolaten von verschiedenen Patienten festgestellt werden kann. Das trifft insbesondere für die Gattungen Klebsiella, Proteus und Providencia zu.[16]

Von einer Arbeitsgruppe am Max von Pettenkofer-Institut wurden erstmals praxisrelevante Typisierungsverfahren für diese Arten, insbesondere auch für die Spezies Proteus rettgeri, erstellt.*) Die Typisierung der Proteus rettgeri-Isolate erfolgt hierbei anhand von Bakteriozinproduktion bzw. -empfindlichkeit.[3,5,8,13]

Der sachgerechte Umgang mit derartigen biologischen Verfahren setzt genaue Kenntnis der Substanzen voraus, auf denen der Test beruht, im vorliegenden Fall also der Rettgerocine. Erst die Kenntnis der Eigenschaften dieser Marker erlaubt rationales Erfassen der Faktoren, die zur Standardisierung der Routineverfahren und für die Reproduzierbarkeit der Resultate erforderlich sind.

In der vorliegenden Arbeit sollten deshalb Hemmstoffe von 53 verschiedenen Proteus rettgeri-Isolaten

*) neuerdings "Providencia rettgeri"

aus drei Kontinenten (Amerika, Asien, Europa) mit biologischen, biochemischen und biophysikalischen Verfahren analysiert, charakterisiert und klassifiziert werden.

II. Material und Methoden

1. Material

a) Stämme

Proteus rettgeri, DENVER (Dr. Ianinni, Veterans Administration Hospital, Denver, Colorado)

44 Stämme:

D1	D10	D19	D27	D37
D2a	D11a	D20	D28	D38
D2b	D11b	D21	D29	D39
D3	D12	D22	D30	D40a
D4	D14	D23	D31	D40b
D6	D15a	D24	D32	D41
D7	D15b	D25	D33	D42
D8a	D16	D26a	D34	D43
D8b	D18	D26b	D35	

Proteus rettgeri, ESSEN (Dr. Linzenmeier, Institut für Medizinische Mikrobiologie, Robert-Koch-Haus, Klinikum Essen)

5 Stämme:

E6	E7	E12	E17	E18

Proteus rettgeri, HONGKONG (Dr. Huang, Queen Elizabeth Hospital, Hongkong)

10 Stämme:

H9	H17	H24	H27b	H32
H11	H21	H27a	H28	H33

Proteus rettgeri JAPAN (Dr. Shigeo Namioka, National Institute of Animal Health, Tokyo)[20]

12 Stämme:	Serotyp:
	O : H
J3	5 : 3
J5	7 : 5
J9	11 : 16
J10	12 : 1
J38	23 : 1
J42	24 : 12
J50	26 : 22
J52	26 : 1
J55	17 : Cl : -
J56	27 : 8
J67	29 : 4
J87	22 : 1

Proteus rettgeri MÜNCHEN (im Münchner Klinikbereich isolierter neuer Biotyp von Proteus rettgeri)[21]

4 Stämme:

M11 M116 M199 M200

b) Medien, Reagenzien

Mueller-Hinton-Broth (MHB) pH 7,4
Difco-Laboratories, Detroit
21,0 g auf 1000 ml aqua deion.

Tryptone-Soya-Broth (TSB) pH 7,3
Oxoid Ltd., London
30,0 g auf 1000 ml aqua deion.

Pepton-Bouillon, pH 7,4
Rezeptur Max von Pettenkofer-Institut, München

Pepton e carne trypt."Merck"	25 g
NaCl	3 g
K_2HPO_4	2 g

auf 1000 ml aqua deion.

Pepton-Agar
Bouillon + 20 g Bacto-Agar (Difco Lab., Detroit)

Mueller-Hinton-Agar 1,0 % bzw. 1,5 %
wie MHB, zusätzlich auf 1000 ml aqua deion.
10 g bzw. 15 g Bacto-Agar (Difco Lab., Detroit)

Soft-Agar (0,7 %)
7 g Bacto-Agar (Difco Lab., Detroit) auf
1000 ml aqua deion.

Chloroform pro analysi (Merck, Darmstadt)

Mitomycin C (for injection Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd., Tokyo), gelöst in Methanol p.A. (Merck, Darmstadt)
Konzentration photometrisch bei 360 nm bestimmt.[13]

Phosphatpuffer 0,06 molar

pH	Vol.-% 1/15 mol Lösung	
	KH_2PO_4	$Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$
4,9	99,4	0,6
5,9	50,2	9,8
6,8	50,0	50,0
7,9	4,5	95,5

auf 1000 ml aqua deion.

Saccharose zur Dichtegradientenzentrifugation, Ribonuclease und Desoxyribonuclease nicht nachweisbar (Merck, Darmstadt).

Ammoniumsulfat zur Analyse (Merck, Darmstadt).

Trypsin aus Rinderpankreas, lyophilisiert, salzfrei, Fremdaktivität 0,5 % Chymotrypsin (Serva, Heidelberg).

Wäßriges Phenol
Phenol (zur Analyse, Merck) wurde in aqua deion. gelöst. Die phenolgesättigte wäßrige Phase wurde für die Experimente verwendet.

Dodecylhydrogensulfat-Natriumsalz für biochemische Zwecke und Tensiduntersuchungen (Merck, Darmstadt).

Hyperimmunseren aus Kaninchen gegen O-Antigen von Proteus rettgeri und gegen Rettgerocine wurden von H. Baumgarten[5)] übernommen.

c) Geräte

Photometer
Beckman Model C Colorimeter Filter 660 nm
Gilford Spectrophotometer 240

Inkubator für geschüttelte Flüssigkulturen:
New Brunsweick Controlled Environment Incubator Shaker

Zentrifugen

Zentrifuge	Rotortyp	Drehzahl (rpm)	rel. Beschleunigung (g)
Sorvall RC 2b	SS34	12000	17300
		10000	12100
Beckman	SW50.1	30000	84000
Spinco L50		35000	114000
	Ti 50	45000	133573

Einrichtung zum Mischen und Austropfen von Dichtegradienten:
H. Hölzel Technik, D-8250 Dorfen/Obb.

2. Methoden

a) Rettgerocinherstellung

Um die Rettgerocine näher untersuchen zu können, mußten Kulturüberstände in hinreichender Menge und mit möglichst hoher Rettgerocinkonzentration hergestellt werden. Dazu wurden Flüssigkulturen der rettgerocinproduzierenden Stämme folgendermaßen hochgezogen: logarithmisch wachsende Keime aus einer Vorkultur wurden in einer Dichte von 5×10^7/ml (A660 nm 0,050) in 20 ml TSB in Seitarmkolben mit Dellen eingesät. Bebrütet wurde bei 32° C, wobei während der ersten 8 Stunden zusätzlich mit 150 rpm gerührt wurde. Die Gesamtbebrütungszeit (8 bis 24 Stunden) und die Mitomycinkonzentration (0,1 bis 0,5 µg/ml) wurden für den jeweiligen Producer optimal gewählt.[5)]

Im Anschluß an die Bebrütung wurden die Bakterien bei 10000 rpm 30 min lang abzentrifugiert

(Sorvall, Rotor SS34). Der Überstand wurde mit 1/10 seines Volumens an Chloroform versetzt und geschüttelt, um die verbliebenen Bakterien abzutöten.

Die so gewonnenen Rettgerocinsuspensionen wurden zusammen mit dem Chloroform bei +4° C aufbewahrt.

b) Rettgerocinnachweis

Der Hemmstoffnachweis erfolgt auf Rasen von Indikatorbakterien in Kunststoffpetrischalen von 9 cm Durchmesser. Um gleichmäßige Rasen und damit gute Reproduzierbarkeit zu erreichen, wurde 0,1 ml einer Indikatorvorkultur von 5 x 10^7 Keimen/ml in TSB in 3 ml Softagar (56° C) suspendiert und auf eine Grundschicht von 20 ml MHA gegossen. Rasen und Grundschicht wurden auf eine waagerecht austarierten Glasplatte gegossen, um in der gesamten Petrischale einheitliche Schichtdicke zu erreichen.

Auf die Rasen wurden etwa 1,5 µl der Rettgerocinlösungen mit einer Platinöse aufgetragen. Nach dem Antrocknen wurden die Platten 4 Stunden bei 37° C bebrütet, dann über Nacht bei Zimmertemperatur belassen. Im Falle einer Hemmung wurden am Ort des Tropfens die folgenden Veränderungen am Indikatorrasen festgestellt

+/- gerade erkennbar geschwächtes Wachstum

1 deutlich geschwächtes Wachstum, aber noch keine isolierten Kolonien erkennbar.

2 Hemmung wie 1, aber im Randbereich des Tropfens nur noch vereinzelte Kolonien, oder aber stark geschwächtes Wachstum, bei dem Einzelkolonien gerade eben erkennbar werden.

3 nur noch vereinzelte Kolonien auf der gesamten Tropfenfläche

4 kein Indikatorwachstum

War die Wachstumshemmung vom Grad 1 oder stärker, so war meist auch in verdünntem Überstand noch Hemmaktivität nachweisbar. Die höchste Verdünnungsstufe, die noch einen +/--Effekt hervorrief, wurde als "Titer" definiert. Die Hemmstofflösungen wurden jeweils in Zehnerschritten so weit herunterverdünnt, bis keine Hemmung mehr nachweisbar war.

c) Rettgerocinanreicherung durch Sedimentieren

Jeweils 11,5 ml Kulturüberstand wurden in Cellulosenitratrohren in einem Beckman Ti50 Festwinkelrotor zentrifugiert (45000 rpm, 60 min bei +7° C). Anschließend wurden mit Pipetten und Peleusball 9/10 des ursprünglichen Volumens abgezogen und verworfen. Das Sediment wurde im verbleibenden Volumen resuspendiert, so daß die sedimentierten Substanzen zehnfach angereichert waren.

d) Diffusionstest

Untersucht wurde die Diffusionsfähigkeit der Rettgerocine in MHA 1,0 %. Dazu wurden 20 ml Agar in Petrischalen von 9 cm Durchmesser gegossen und mit einem sterilen Stanzer je zwei Löcher von 11,5 mm Durchmesser in die erstarrte Schicht gestanzt. In diese Löcher wurden jeweils 0,15 ml Rettgerocinlösung eingefüllt, die durch Verdünnen oder Anreichern auf einen Titer von 1:100 gebracht worden war. Anschließend wurden die Platten 40 Stunden bei Zimmertemperatur belassen. Danach wurde zum Nachweis des Rettgerocins ein Rasen von Indikatorbakterien (0,1 ml einer logarithmisch wachsenden Vorkultur mit einer Dichte von 5×10^7/ml in 2,5 ml Softagar) so auf die Grundschicht gegossen, daß die Löcher freiblieben. Nach

Bebrüten bei 37° C für 4 Stunden und Belassen bei Zimmertemperatur über Nacht wurden die Breiten der Hemmhöfe um die Löcher herum bestimmt und der Hemmungsgrad beurteilt. Die Hemmhofbreiten wurden in drei Klassen eingeteilt:

+	bei Hemmhofbreite 1-2,5 mm
++	bei Hemmhofbreite 2,5-4,0 mm
+++	bei Hemmhofbreite über 4,0 mm

Um unspezifische Effekte auszuschließen, wurde der Versuch auch noch mit dem Überstand eines nicht rettgerocinproduzierenden Stammes und mit mitomycinhaltigem (1,0 µg/ml), unbewachsenem TSB durchgeführt (Producernegativkontrolle). In einem Parallelversuch wurden Platten im Anschluß an die Diffusion des Rettgerocins mit einem unempfindlichen Stamm (M200) als Rasen übergossen (Indikatornegativkontrolle).

Ein Phagenlysat wurde dem gleichen Versuch unterzogen, um zu prüfen, ob der Diffusionstest geeignet ist zur Unterscheidung zwischen Phage und Rettgerocin (Phagenpositivkontrolle).

e) Bestimmung des Sedimentationsverhaltens

Lineare Saccharosegradienten von 5 bis 20 % wurden mit Hilfe von zwei verbundenen Rohren hergestellt. In ein Rohr wurden 2,2 ml 5 %-ige Saccharoselösung eingefüllt, in das andere 2,2 ml 20 %-ige. Die Durchmischung der Stammlösungen erfolgte durch eine rotierende Plexiglasschraube in dem Rohr mit 20 %-iger Lösung. Aus einem Ablaufschlauch am Boden dieses Rohrs wurden die Gradienten in Cellulosenitratrohren aufgefangen.

Die Gradienten wurden mit bis zu 0,8 ml Rettgerocinsuspension überschichtet und 45 min lang bei 30000 rpm, 20° C, i einem Beckman SW50.1-Rotor zentrifugiert.

Anschließend wurden die Zentrifugenrohre in ein Stativ eingespannt, luftdicht abgeschlossen und mit einer ölgefüllten Spritze verbunden, deren Stempel durch Drehen an einer Schraube feindosiert bewegt werden konnte. Am tiefsten Punkt wurden die Rohre mit einer Kanüle angestochen und der Inhalt durch Hineindrehen des Stempels in die Spritze in Fraktionen von 12 Tropfen (≙ 250 µl) ablaufen gelassen und in Glasröhrchen von 10 mm Durchmesser gesammelt.

Der Hemmstoffnachweis in den Fraktionen erfolgte wie unter 2.2. beschrieben. Die 16-20 Tropfen (einer von jeder Fraktion) wurden in einer fortlaufenden Kette auf dem Indikatorrasen angeordnet, um einen direkten Vergleich von Fraktion zu Fraktion zu haben. So war die Fraktion mit der stärksten Hemmstoffkonzentration sicher zu erkennen. Mußte in mehreren Fraktionen mit dem Hemmungsgrad 4 gerechnet werden, so wurden Verdünnungsreihen in Zehnerschritten hergestellt und ebenfalls auf Indikatorrasen getropft.

f) Nachweis von rettgerocininaktivierenden Substanzen

Proben von Kulturüberständen wurden auf Inaktivatorgehalt untersucht, indem sie mit dem gleichen Volumen Rettgerocinsuspension zusammengegeben und für eine Stunde bei Zimmertemperatur belassen wurden. Anschließend wurde das Gemisch neben einer Kontrolle von 1:2 verdünnter Rettgerocinsuspension auf einen Indikatorrasen aufgetropft. Der Indikatorstamm mußte so gewählt sein, daß sein Wachstum vom inaktivatorhaltigen Überstand, der ja auch Rettgerocin enthielt, nicht gehemmt wurde.

Bei Inaktivierung war das Wachstum des Indikators im Vergleich zur Kontrolle durch das Gemisch weniger oder gar nicht mehr gehemmt.

Die Konzentrationen an Inaktivator in verschiedenen Präparationen wurden verglichen, indem Verdünnungsreihen dieser Präparationen mit Rettgerocinsuspensionen versetzt wurden, die auf eine Hemmungsstärke von Grad 2 eingestellt waren. Als "Titer" des Inaktivators wurde die Verdünnungsstufe angegeben, die gerade noch die Rettgerocinwirkung vermindern konnte.

g) Verfahren zur Charakterisierung der rettgerocininaktivierenden Substanzen

aa) Ammoniumsulfatfällung

In inaktivatorhaltigem Überstand wurden bei 25° C 343 g/l Ammoniumsulfat gelöst und diese gesättigte Lösung über Nacht bei 4° C belassen. Das entstandene Präzipitat wurde 30 min lang bei 10000 rpm, 4° C (Sorvall, SS34) abzentrifugiert. Dann wurde der Überstand abgetrennt und das Sediment in 1/20 des Ausgangsvolumens aufgenommen. Zur Entfernung des Ammoniumsulfats wurde 6 Stunden lang gegen Phosphatpuffer 0,06 molar, pH 6,8, dialysiert.

Der Grad der Inaktivatoranreicherung im Sediment wurde durch Bestimmung der Konzentrationen in Überstand und Sediment festgestellt.

bb) Trypsinbehandlung

50 µl Trypsinstammlösung (1 mg/ml) wurden mit 450 µl inaktivatorhaltigem Überstand gemischt und über Nacht in einem Wasserbad von 37° C belassen. Anschließend wurde der Inaktivatorgehalt im Vergleich zum unbehandelten Überstand bestimmt.

cc) Phenolextraktion

2 Teile inaktivatorhaltigen Überstands wurden mit 1 Teil wäßrigem Phenol 5 min lang in einem Schüttelzylinder geschüttelt. Nach beschleunigtem Trennen der Phasen durch Zentrifugieren (12000 rpm, 20 min, 4° C, Sorvall SS34) wurde die wäßrige Phase noch zweimal auf dieselbe Weise behandelt. Anschließend wurden die Phenolreste durch sorgfältiges Dialysieren gegen Phosphatpuffer 0,06 molar, pH 6,8, über 3 Tage mit dreimaligem Pufferwechsel entfernt. Das war aufgrund der starken bakteriziden Wirkung von Phenol erforderlich. Entfernen des Phenols wurde im UV-Absorptionsspektrum kontrolliert. Schließlich wurde der Inaktivatorgehalt im Vergleich zum Ausgangsmaterial bestimmt.

dd) Behandlung mit Natriumdodecylsulfat (SDS)

Jeweils 0,96 ml inaktivatorhaltiger Kulturüberstand wurde mit 0,04 ml SDS-Stammlösung von 25 %, 2,5 %, 0,25 % und 0,025 % versetzt, so daß sich SDS-Konzentrationen von 1 % bis 0,001 % ergaben. Nach 1 Stunde bei Zimmertemperatur wurde der Inaktivatorgehalt im Vergleich zum unbehandelten Material bestimmt.

ee) Präzipitation mit Proteus rettgeri-anti-O-Serum

Gleiche Teile Anti-O-Serum und zellfreier Kulturüberstand des homologen oder eines serologisch verwandten Stammes wurden gemischt und während 24 Stunden bei 37° C inkubiert. Das Präzipitat wurde abzentrifugiert (Ecco Superior Zentrifuge, 45 min) und der Überstand auf seinen Inaktivatorgehalt im Vergleich zum 1:2 verdünnten Ausgangsmaterial untersucht.

ff) Antikörpernachweis im Agardiffusionstest nach Ouchterlony

Glasobjektträger wurden mit 2 ml 0,6 %-iger Agarose

beschichtet und in die Schicht Löcher von 3 mm Durchmesser im Abstand von 5 mm (gemessen von Lochrand zu Lochrand) gestanzt, so daß um ein zentrales Loch ein Ring von 6 Löchern angeordnet war.

Die Löcher wurden dann mit Hilfe von Glaskapillaren mit Antigen- bzw. Antikörperpräparationen aufgefüllt. Antigen und Antikörper befanden sich jeweils in benachbarten Löchern.

Nach 24 Stunden Diffusion bei Zimmertemperatur wurden nichtpräzipitierte Eiweißreste durch 48 Stunden Spülen in 0,9 % NaCl bei Zimmertemperatur entfernt. Anschließend wurde die Agarschicht bei 37° C eingetrocknet. Die Präzipitate wurden mit Eosin eingefärbt.

III. Ergebnisse

1. Stabilität von Rettgerocinen und Bakteriophagen

Chloroformierte Rettgerocinsuspensionen wurden titriert und dann bei 4° C in Dunkelheit aufbewahrt. Nach einer Woche, einem Monat und drei Monaten wurden sie wieder gegen alle Indikatoren titriert.

Als stabil (++) wurden jene Rettgerocine bezeichnet, von deren Aktivität nach n e u n z i g Tagen noch wenigstens 50 % erhalten waren, als relativ stabil (+) jene mit 50 % Restaktivität nach d r e i ß i Tagen und als labil (-) alle Rettgerocine, bei denen bereits nach s i e b e n Tagen weniger als 50 % der Ausgangsaktivität nachweisbar waren (Tab. 1).

Alle stabilen bzw. relativ stabilen Hemmstoffe zeichneten sich dadurchaus, daß sie von vornherein einen höheren Titer hatten oder aber Phagen waren. Dagegen zeigten die labilen Rettgerocine (51 %) durch-

wegs niedrige Ausgangstiter. Zwei Phagen, nämlich P7 und P8, erwiesen sich überraschend als labil (Tab.2).

Tab. 1: Rettgerocine, Producerstämme, Indikatoren, Stabilität

Rettgerocin	Producer[1)]	Indikatoren[1)]	Stabilität
R1	D3, D4, D7, D10, D11a, D11b, D12, D14, D16, D19, D20, D22, D23, D42	D15a, D15b, D18, D37, D38, D40a, D40b, H27b, J38, J42, J52, J55, J87	++
R2	D34	D15b, D18,D40b, H27b, J38, J87	+
R3	D43	D15b, D18, D34, D37, D38, D40a, D40b, E12, E18, H9, H27a, H27b, J3, J5, J10, J38, J42, J50, J56, J67, J87, M11, M116, M199	++
R4[3)]	E12	J3, J5, J9, J38, J50, J52, J55, J56	++
R5[3)]	E12	D3, H27b, J9, J10, J38, J87, M11, M116, M199	++
R6	D15a, D15b	D3, D34, E7, E12, E18, H9, H24, H27a, H27b, J3, J9, J10, J38, J56, J67, J87, M11, M116, M199	++
R7	D6, D21,D24,D32	J9	+
R8	D25	J9, J52, J55	++
R9	D28	D15b, J3, J50, J52, J55, J87, M11	+

Tab. 1: Fortsetzung

Rettgerocin	Producer[1)]	Indikatoren[1)]	Stabilität[2)]
R10	D41	E7, H9, H27a, H27b, J9, J56, M116	-
R11[4)]	D8b, D40b	D18, D40a	-
R12[4)]	D8b, D40b	M11	-
R13	D28b	D18, D38, D40a	-
R14	D2a, D2b	M11	-
R15[5)]	D8a, D40a	M11, M116	-
R16[5)]	D1, D26a, D26b, D27, D30, D31, D33, D35, D37, D39	M11, M116	-
R17	H9, H11, H17, H21, H24, H32, H33	E7, J3, J9	-
R18	H27a, H28	E7, E12, H9, H27b, J5	-
R19	E7	H24, J9	-
J5[6)]	J5	D3, H27b, J9, J10, J38, J52, J55, J87, M11, M116, M119	++

1) Nach H. Baumgarten [5)]

2) Erläuterungen siehe III.1.

3) R4/R5 unterscheiden sich durch ihr Sedeimentationsverhalten (III.4.)

4) R11/R12 unterscheiden sich durch ihr Sedimentationsverhalten (III.4.)

5) R15/R16 unterscheiden sich nach H. Baumgarten[5)] serologisch

6) J5 wurde von B. Hellinger[9)] beschrieben und hier als Marker zur Bestimmung des Sedimentationsverhaltens (III.4.3.) herangezogen.

Tab. 2: Temperente Phagen, Producerstämme, Indikatoren, Stabilität[1)]

Phage	Producer=lysogener Stamm	Indikator = Wirt	Stabilität
P1a[2)]	D2a, D2b	M116	+
P1b[2)]	D25	M116	++
P2[2)]	D28	M116	++
P3	D8b, D40b	D37, D38	+
P4[3)]	D29	J87	+
P5	D34	J42	++
P6[3)]	D34	J87	++
P7[3)]	H27a, H28	J87	-
P8	E17	E7, J9	-

1) Bis auf die Stabilität wurden die Angaben von H. Baumgarten [5)] mitgeteilt

2) P1a/P1b verhalten sich unterschiedlich im Saccharosegradienten (III.4.); P2 erzeugt eine andere Plaque-Morphologie [5)]

3) Außer in ihrer Stabilität unterscheiden sich P4, P6 und P7 serologisch [5)]

2. Sedimentierbarkeit der untersuchten Hemmstoffe durch Ultrazentrifugation

Bis auf eine Ausnahme (s. u.) ließen sich alle Rettgerocine und temperenten Phagen durch Ultrazentrifugation auf das Zehnfache ihrer Ausgangsaktivität anreichern. Bei hochtitrigem Ausgangsmaterial (Titer $\geq 10^2$) zeigt das Sediment eine bis zu 1000-fach höhere Aktivität als der Überstand. Bei niedriger Ausgangsaktivität fand sich im Überstand gar kein Hemmstoff mehr.

Nicht sedimentierbar war dagegen R4. Die Titer in Ausgangsmaterial, Sediment und Überstand waren hier gleich.

3. Diffusionsfähigkeit (Tab. 3)

Das Diffusionsverhalten der Kulturüberstände bei 9 Producern gegen jeweils mehrere Indikatoren zeigte gleichzeitig ein Rettgerocin und einen temperenten Phagen an (Produces D2a, D2b, D8b, D25, D28, D34, D40b, H27a und H28). Diese Ergebnisse stimmen mit denen von H. Baumgarten[5] überein.

Den bei weitem größten Hemmhof erzeugte R4, nämlich zwischen 6 und 10 mm Breite (+++) je nach Indikator. Die Hemmhöfe waren zusätzlich durch einen unscharfen Rand charakterisiert, d. h. der Lysegrad des Indikatorrasens nahm in einem Bereich von etwa 2 mm Breite kontinuierlich ab. Nach Verdünnen des E12-Überstands wurden die Hemmhöfe wesentlich schmaler und zeigten - außer gegen den empfindlichsten Indikator J56 - einen scharfen Rand.

Eine Hemmhofbreite zwischen 2 und 4 mm (++) fand sich bei 6 von 28 Hemmstoffen, d. h. bei 38 % der diffundierenden bzw. bei 21 % aller Hemmstoffe.

Eine Hemmhofbreite zwischen 1 und 2,5 mm (+) fand sich bei 10 Hemmstoffen, d. h. bei 63 % der diffundierenden bzw. bei 36 % aller Hemmstoffe. Zu dieser Klasse gehören alle stabilen Phagen und auch R6, das unter den Rettgerocinen durch seine ungewöhnliche Randschärfe auffiel.

Tab. 3: Diffusionsvermögen der Hemmstoffe

Hemmstoff	Titer	Breite des Hemmhofs	Lysegrad	Randschärfe	Besonderheiten	
R1	10^2	++	4	++		
R2	10^2	++	4	+		
R3	10^2	++	4	++		
R4	10	+++	4	-		
R5	10^2	++	4	++		
R6	10^2	+	4	+++		
R7	10^2	+	4	++		
R8	10^2	++	4	++		
R9	10^2	++	4	++		
R10	10	-	-	Ø		
R11	10^2	-	-	Ø		
R12	10^2	-	-	Ø		
R13	10	-	-	Ø		
R14	10^2	-	-	Ø		
R15	10	-	-	Ø		
R16	10	-	-	Ø		
R17	10^2	-	-	Ø		
R18	10^2	-	-	Ø		
R19	10^2	-	-	Ø		
P1a	10^2	+	4	+++	gezahnter Rand	verschleppte Plaques
P1b	10^2	+	3	+++	"	"
P2	10^2	+	3	+++	"	"
P3	10^2	+	3	+	"	"
P4	10^2	+	3	+++	"	"
P5 P6	10^2	+	2	+++	"	"
P7	10^2	-	-	Ø		"
P8	10^2	+	3	+++	"	"

Ergänzung zu Tab. 3: Durchgeführte Kontrollversuche

Testmaterial	Indikator	Hemmhofbreite	Lysegrad	Randstruktur	Auffälligkeiten
Phagenlysat v. Proteus morganii ATCC	Pt. morg. ATCC	+	4	gezahnt	verschleppte Plaques
TSB, 1,0 µg Mito/ml	H24, J87	-	Ø	schleimig	
0,9 % NaCl	M200[1)]	-	Ø	schleimig	
R4 + R5	M200[1)]	-	Ø	schleimig	
Überstand E6 [2)]	H27b, J87	-	Ø	schleimig	
Keines	H27b, J87	-	Ø	schleimig	

1) Kein Indikator

2) Kein Producer

4. Bestimmung des Sedimentationsverhaltens

a) Optimierung der Methode

In Vorversuchen stellt sich heraus, daß der Rettgerocintiter nach Ultrazentrifugation im Saccharosegradienten in der Fraktion größter Anreicherung nunmehr 1/10 bis 1/2 des Titers im überschichteten Material betrug. Es konnte deshalb nur Material überschichtet werden, das einen Titer von reichlich 10 hatte, damit in der Fraktion höchster Aktivität wenigstens eine Lyse von Grad 1 erreicht wurde.

Saccharosegradienten lassen sich manuell nicht völlig reproduzierbar herstellen. Daher lag der Peak eines bestimmten Rettgerocins zwar bei 6 Gradienten, die gleichzeitig zentrifugiert wurden, immer in derselben Fraktion. Diese differierte aber geringfügig von Tag zu Tag um ma-

ximal +/- eine Fraktion (Tab. 4). Es sollte daher jeweils ein unbekanntes Rettgerocin mit einem Rettgerocin bekannter Sedimentationskonstante (Marker) auf denselben Gradienten überschichtet werden.

Dabei waren bei einigen Kombinationen von Überständen entweder eines der beiden Rettgerocine abgeschwächt oder gar nicht mehr nachweisbar, oder es hatten beide Rettgerocine Aktivität verloren. Manchmal war auch ihre relative Lage zueinander im Gradienten nicht reproduzierbar. Dies zeigte sich besonders gut am Beispiel von D3 und J5. Je nach Mengenverhältnis der Überstände zueinander schwankte der Peak von J5 zwischen Fraktion 8 und 13, während der von R1 immer in Fraktion 10 lag:

Eingefüllter $_2$Überstand mit Titer 10^2	J5 in Fraktion	D3 in Fraktion
500 µl D3 + 50 µl J5	8	10
100 µl D3 + 100 µl J5	10	10
100 µl D3 + 500 µl J5	13	10

Diese Peakverschiebungen und Titerverluste traten auch bei anderen Kombinationen auf und waren auf rettgerocininaktivierende Substanzen (siehe III.5.) in den Überständen zurückzuführen.

Um Inaktivierungen auszuschließen, wurden die gemeinsam zu überschichtenden Überstände in einem Vorversuch im späteren Mengenverhältnis zusammen inkubiert und auf Aktivitätsverluste hin untersucht. Damit ließen sich jedoch die Verhältnisse im Gradienten nicht exakt nachahmen und andersartige Wechselwirkungen nicht ausschließen.

Deshalb und um den Gradienten auf alle empfindlichen Indikatoren auftropfen zu können (siehe III.4.2.), wurde

jeder Überstand erst einzeln zentrifugiert. So konnte einerseits schon der Peak näherungsweise lokalisiert werden, um Peakverschiebungen später sicher zu erkennen. Andererseits wurde ersichtlich, ob bei verschiedenen Indikatoren der Peak in anderen Fraktionen lag, woraus man auf das Vorliegen mehrerer Hemmstoffe in einem Überstand schließen konnte.

Erst dann wurde das Rettgerocin mit einem geeigneten Marker zusammen zentrifugiert und die Lage der Peaks zueinander bestimmt.

b) Markerauswahl nach selektiven Indikatoren

Nach Möglichkeit wurde das Rettgerocin J5 als Marker gewählt, da sein Molekulargewicht von 2×10^7 bekannt war.[4] In vielen Fällen mußten dazu erst J5-inaktivierende Substanzen mit Anti-O-Serum ausgefällt werden.

Einige Rettgerocine hemmten nur Indikatoren, die auch gegen Rettgerocin J5 empfindlich waren (R7, R8, R12, R14, R15, R16). Das gleiche galt auch für die Mehrzahl der Phagen. Hier wurde ein anderes Rettgerocin als Marker gewählt, das folgende Eigenschaften haben sollte:

aa) möglichst wenig gemeinsame Indikatoren mit dem untersuchten Hemmstoff;
bb) möglichst hoher Titer, um nur kleine Volumina überschichten zu müssen;
cc) scharfer Peak.

Diese Anforderungen erfüllten am besten R1 und R8.

Um die Lage der Marker-Peaks zu bestimmen, wurden grundsätzlich folgende Indikatoren gewählt: für J5: J9, J38, J87; für R1: D18, D40a, J38; für R8: J9.

Es wurden jeweils 10 µl Markerüberstand mit einem Titer von 10^2 überschichtet.

c) Sedimentationskonstante und Molekulargewicht von J5 und den anderen Markern

Das von J5 gebildete Rettgerocin hat ein Molekulargewicht von 2×10^{7}.[4] Die beiden anderen Marker, R1 und R8, laufen im Saccharosegradienten eine Fraktion vor J5. Dies entspricht einem um ca. 10 % höheren Molekulargewicht.

d) Lage der Peaks im Saccharosegradienten

Je nach Titer des Rettgerocins bzw. Empfindlichkeit der Indikatoren wurden bis zu 0,6 ml Überstand (zusammen mit Marker 0,7 ml) überschichtet. Nur bei 5 Producern lagen die Peaks abhängig von den Indikatoren in verschiedenen Fraktionen (D34, E12, D8b, D40b, D26b), bei den übrigen 47 lagen die Peaks gegen alle empfindlichen Indiaktoren gleich, von gleichzeitig vorhandenen Phagen abgesehen.

Von den 9 Phagen zeigten 6 eine am Boden des Gradienten angereicherte Aktivität, die kontinuierlich bis Fraktion 20 abnahm. Bei D34 waren 2 Aktivitätsmaxima, eines am Boden gegen J87 und J42 und eines in der Mitte des Gradienten gegen J42, nachweisbar (P5, P6). Pla war nur in den Fraktionen 1-6 und 12-20 nachweisbar, dort, wo das im Überstand von D2a und D2b ebenfalls vorhandene R14 (Fraktionen 7-11) nicht zu finden war.

Von den 19 Rettgerocinen waren R3 und R9 gleich schwer wie J5, R4 und R6 waren leichter und die übrigen schwerer.

e) Ergänzende Untersuchungen bei R4

Es wurde versucht, bei verschärften Bedingungen R4 in den Gradienten hineinzuzentrifugieren. Nach 5 Stunden Ultrazentrifugation bei 35000 rpm (Rotor SW50.1) hatte es seinen Peak in der 16. von 20 Fraktionen, während R5 am Boden des Gradienten in den Fraktionen 3 bis 4 lag.

Tab. 4: Sedimentationsverhalten der Rettgerocine

Rettgero-cin	Producer	Indikatoren[1)]	Peak	Marker	Peak	abgesättigt mit
R1	D3, 4,10, 12, 14,19, 22, 42		10	J5	11	Anti D3
	D11a, 16, 23		9	J5	10	Anti D3
	D7, 11b 20		11	J5	12	Anti D3
R2	D34	D18, 40a, 40b J87	2+11	R8	11	Ø
R3	D43		10	J5	10	Ø
R4+5	E12	J56 M11 J9, J88	18-20 9 9, 17-20	R1	10	Ø
R6	D15a+b		12	J5	11	Ø
R7	D6, 21, 24,32		9	R1	10	Anti D6
R8	D25		9	R1	9	Ø
R9	D28		11	R8	10	Ø
R10	D41		11	R1	11	Ø
R11+12	D8b, 40b	D18, 40a, M11	3 10	R8	11	Ø
R13+16	D26b	D18, 38, 40a M11, 116	3 10	R8 R1	11 11	Ø Anti D1
R14	D2a+b		9	R8	10	Ø
R15	D8a, 40a		9	R1	10	Anti D1
R16	D1, 26a+b, 27, 30, 31, 33,35, 37, 39		9	R1	10	Anti D1
R17	H9, 11, 17, 21, 24, 32, 33		3	R1	10	Ø
R18	H27a, 28		2-3, 16	R1	10	Ø
R19	E7		3	R1	10	Ø

1) Nur angegeben, wenn der Peak nicht bei allen Indikatoren gleich lag

Ergänzung zu Tab. 4: Dichtegradienten der untersuchten Phagen

Phage	Wirt	Peak	Marker	Peak	abgesättigt mit
P1a	D2a+b	1-6, 12-20	R1	10	Anti D1
P1b	D25	1-5	R1	9	Ø
P2	D28	1-7	R1	10	Anti D3
P3	D8b,40b	1-4	J5	11	Ø
P4	D29	1-2	R8	10	Ø
P5+6	D34	2,11 auf J42 1-7 auf J87	R8	11	Ø
P7	H27a,28	1-5	R8	10	Ø
P8	E17	1-3	R1	10	Ø

5. Rettgerocininaktivatoren

a) Von D3 gebildeter Inaktivator

Da inaktivierende Substanzen zuerst in Rettgerocinsuspensionen nachweisbar waren, wurden auch im folgenden die Inaktivatoren in zellfreien Kulturüberständen untersucht, die wie in II.2.a) beschrieben, hergestellt wurden. Zum Vergleich wurden - so vorhanden - die Rettgerocine in den Überständen ebenfalls titriert.

Der von D3 in den Kulturüberstand abgegebene Inaktivator wurde am Aktivitätsverlust des Rettgerocins J5 gemessen. Indikator für J5 ist J9. J9 ist dabei nicht empfindlich für das im D3-Überstand ebenfalls enthaltene R1, das auf den Indiaktoren D40b, D18 und D49a nachgewiesen wurde

aa) Titer in unbehandeltem D3-Überstand
In einer Rettgerocinlösung des Producers D3 hatte R1 einen Titer von 10^3, der Inaktivator von 10^2.

bb) Dialysierbarkeit
Nach Dialyse gegen Phosphatpuffer 0,06 molar, pH 6,8 zeigten sowohl R1 mit 5×10^3 als auch der Inaktivator mit 2×10^2 einen leicht erhöhten Titer.

cc) Fällbarkeit durch Ammoniumsulfat
Nach Ammoniumsulfatfällung waren beide Substanzen im Vergleich zum Ausgangsmaterial 100-fach angereichert. Im Sediment betrug der Titer des Inaktivators 10^4 und der des Rettgerocins 10^5, während im Überstand beide nur noch einen Titer von 10 hatten.

dd) Sedimentierbarkeit durch Ultrazentrifugation
Durch 60 min Ultrazentrifugation bei 45000 rpm in einem Ti50-Rotor wurde der Inaktivator ebenso wie R1 fast vollständig sedimentiert. Beide waren im Überstand nur noch unverdünnt nachweisbar, während sie im Sediment 10-fach angereichert waren.

ee) Filtrierbarkeit und Adsorption an Filter
Durch Filtrieren des D3-Überstands sollten R1 und Inaktivator getrennt werden. Die Adsorption einer der beiden Substanzen an Acetat-, Nitrat- oder Millipore-Filter hätte dies ermöglicht. Beide Substanzen passierten jedoch alle Filter. Dabei änderte der Inaktivator seinen Titer nicht, während sich die R1-Aktivität nach Filtrieren geringfügig von 10^3 auf 2×10^3 erhöht hatte.

ff) pH-Stabilität von Inaktivator und Rettgerocin
Zur Abklärung der pH-Stabilität ließen wir den D3-Überstand 12 Stunden gegen Phosphatpuffer mit einem pH von 4,9-5,9-6,8 und 7,9 dialysieren. Dabei nahm die Aktivität von R1 bei pH 4,9 auf ein Hundertstel und bei pH 5,9 auf ein Zehntel ab. Bei pH 6,8 und 7,9

nahm sie geringfügig zu (siehe bb)). Der Inaktivator zeigte bei allen pH-Werten gleiche Titer.

gg) Trypsinempfindlichkeit

Der D3-Überstand und einige Kontrollsubstanzen wurden mit Trypsin behandelt. Die Aktivität des Trypsins wur durch Verdau des als empfindlich bekannten Rettgeroci R4 sichergestellt. Die Unempfindlichkeit von Rettgero J5 gegen Trypsin mußte überprüft ewrden, weil eine In aktivierung ja auch durch Trypsin hätte vorgetäuscht werden können (Tab. 5).

Tab. 5: Trypsinempfindlichkeit von Rettgerocin und Inaktivator

Substanz	vorher	nachher	
		mit Trypsin	ohne Trypsin
R1	10^3	5×10^3	10^3
J5	10^2	10^2	10^2
Inaktivator	10^2	10^3	10^2
R4	10	-	10

Es hatte also die Aktivität des Inaktivators auf das 10-fache und die von R1 auf das 5-fache zugenommen.

Eine auf 1:10 verdünnte Trypsinlösung hemmte den Indikatorrasen nicht.

hh) Bildungskinetik des Inaktivators

Aus D3-Kulturen mit Mitomycinkonzentrationen von 0, 0 und 0,25 µg/ml wurden nach 5 und 8 Stunden Proben ent nommen. Dabei ergaben sich für Rettgerocin und Inakti vator folgende Titer:

Tab. 6: Kinetik der Inaktivatorbildung

Mito-Konz. (µg/ml)	5 Stunden			8 Stunden		
	opt. Dichte	RI	Inakt.	opt.Dichte	RI	Inakt.
0	2,0	10	1	4,8	10^2	2
0,1	1,6	10^2	2	3,9	10^3	10
0,25	1,5	10^2	2	3,2	10^3	10^2

Je höher also die Mitomycinkonzentration, je älter die Kultur und je höher der Rettgerocintiter, um so höher war auch der Inaktivatortiter.

ii) Behandlung des Inaktivators mit SDS

Es wurde versucht, durch Natriumdodecyl-hydrogensulfat den Inaktivator selektiv zu zerstören. In den Gemischen aus SDS und Überstand und in den Kontrollen ohne SDS fanden sich folgende Titer:

Tab. 7: SDS-Empfindlichkeit von Rettgerocin und Inaktivator

Substanz	Titer von Rettgerocin bzw. Inaktivator			
	Kontrolle	SDS-Konzentration		
		1 %	0,1 %	0,01 %
RI	10^3	5×10^2	10^3	10^3
J5	10^2	10^2	10^2	10^2
Inaktivator	10^2	1	10	10^2

Während also bei 1 % SDS noch 50 % von RI und 100 % von J5 aktiv waren, hatte der Inaktivator nur mehr eine Restaktivität von 1 %.

1 %-ige SDS-Lösung hemmte die verwendeten Indikatorrasen nicht.

jj) Phenolextraktion des Inaktivators

Durch Phenolextraktion wurde die Bakteriozinaktivitä
von R1 völlig zerstört, während der Inaktivatortiter
von 10^2 auf 10^3 stieg. Der phenolextrahierte Über-
stand hemmte den Indikatorrasen nicht.

kk) Zentrifugation des Inaktivators im Saccharosegradien

Ein Gradient wurde mit 100 µl nativem D3-Überstand,
anderer mit 50 µl Phenolextrakt desselben Überstands
überschichtet. Im Rotor SW50.1 wurde dann 45 min lan
bei 30000 rpm zentrifugiert. Zum Inaktivatornachweis
wurde jede ausgetropfte Fraktion mit 250 µl J5-Über-
stand, Titer 10^2, gemischt. Nach einer Stunde wurde
dann auf die R1- und J5-Indikatoren D18, D40b und J9
aufgetropft.

Der Peak von R1 lag in Fraktion 10, der Inaktiv
tor zeigte breit gestreute Aktivität in Fraktionen 9 bi
15. Der Peak des phenolextrahierten Inaktivators war
ebenfalls breit, lag aber in den Fraktionen 4 bis 11
also näher am Röhrchenboden.

Da im D3-Überstand R1 und Inaktivator nicht gen
gleiche Sedimentationskonstanten aufwiesen, wurde ve
sucht, sie durch schärfere Zentrifugation im Sacchar
segradienten (90 min, 35000 rpm) zu trennen. R1 wurd
unter diesen Bedingungen sedimentiert (Fraktionen 1
2), während der Inaktivator in den Fraktionen 6 bis
lag. Insgesamt war aber sowohl R1 als auch Inaktivat
in allen Fraktionen nachweisbar.

ll) Nachweis von Inaktivator in verschiedenen Untersuchu
materialien

Sowohl in einer zweimal gewaschenen D3-O-Antigenpräp
ration, in der die Bakterien durch 60 min Erhitzen a
100°C abgetötet worden waren, als auch in einer zwei

mal über Saccharosegradienten und einmal über einem CsCl-Gradienten gereinigten R1-Präparation [4] war Inaktivator nachweisbar.

Zentrifugierte man die Zellen aus der O-Antigenpräparation ab, so enthielt der Überstand Inaktivator mit einem Titer von 50. R1 war nicht nachweisbar.

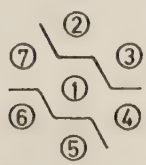
Die R1-Präparation hatte einen R1-Titer von 10^4 und einen Inaktivatortiter von 10^3.

Selbst aus festem MHA-Medium konnten wir nach Wachstum von D3 und anschließendem Entfernen der Producerbakterien Inaktivator mit einem Titer von 10 bei einem gleichzeitigen R1-Titer von 10^2 herauswaschen. Die Extraktion erfolgte durch Auswaschen des zerstoßenen Agars mit 5 ml TSB.

mm) Verhalten des Inaktivators im Immundiffusionstest

Sowohl bei Diffusion des unbehandelten D3-Überstands als auch des Phenolextrakts gegen D3-Anti-O-Serum sah man schmale, ineinander übergehende Präzipitationslinien. Bei Diffusion gegen Anti-R1-Serum ergab sich ebenfalls je eine schmale Linie, die in die anderen Linien, auch die gegen D3-Anti-O-Serum, überging.

Abb. 1: Immundiffusion von Rettgerocin und Inaktivator gegen Anti-Rettgerocin-Serum und Anti-O-Serum



1 D3-Anti-O-Serum
2 Phenolextrakt
3 D3-Überstand
4 Anti-R1-Serum
5 Phenolextrakt
6 D4-Überstand
7 Anti-R1-Serum

Nach Absättigung des D3-Überstands mit Anti-D3-Serum ergab sich kein Präzipitat mehr gegen Anti-R1-Serum und umgekehrt.

nn) Ausfällung durch D3-Anti-O-Serum

Nach Inkubation des D3-Überstands mit gleichen Mengen Anti-D3-Serum war kein Inaktivator mehr nachweisbar. Gleichzeitig stieg aber der R1-Titer von 10^3 auf 2×10^3 an.

oo) Bindungsstärke zwischen Inaktivator, Rettgerocin und Antikörper

Inkubiert man gleiche Mengen J5-Überstand mit einem Titer von 10^2 und D3-Überstand oder Phenolextrakt mit einem Inaktivatortiter von 10^2 bzw. 10^3, so wird das Rettgerocin J5 völlig inaktiviert.

Gibt man zu diesem Gemisch nachträglich die gleiche Menge Anti-D3-Serum, so wird das Rettgerocin J5 wieder voll aktiv. Die Inaktivierung wird also durch Bindung des Inaktivators an Antikörper aufgehoben.

pp) Kinetik der Inaktivierung

Rettgerocin J5 und Inaktivator mit einem Titer von je 10^2 wurden zu gleichen Teilen gemischt.Das Gemisch wurde sofort und dann in bestimmten Zeitabständen auf einen Rasen des J5-Indikators J9 aufgetropft. Das Gemisch bewirkte folgende Lysestärken:

Kontr.	0	5	10	15	20	25	30	60	120 sec
2	+/-	+/-	-/+	-/+	-	-	-	-	-

1:2 in 0,9 % NaCl verdünntes J5 bewirkte eine Lyse vom Grad 2. Die Inaktivierung erfolgt also innerhalb von 20 sec. vollständig.

qq) Wirkungsspektrum des Inaktivators von D3

Der von D3 gebildete Inaktivator hemmt die Aktivität der Rettgerocine J5 und R6. Der Stamm D3 ist empfindlich für diese beiden Hemmstoffe.

b) Inaktivatoren bei anderen untersuchten Stämmen

aa) Vorkommen des Inaktivators von D3

Die Stämme D4, D7, D10, D11a, D11b, D12, D14, D16, D19, D20, D22, D23, D42 bilden nicht nur das gleiche Rettgerocin wie D3, sie geben auch den gleichen Inaktivator in ihren Kulturüberstand ab. Er hat meist einen Titer von 10^2 (Ausnahmen: 2×10^2 bei D10, D20, D22) und hemmt die Aktivität der Rettgerocine J5 und R6. Er läßt sich auch hier durch Sedimentieren zehnfach anreichern und läuft im Saccharosegradienten wie der D3-Inaktivator.

Bei der Immundiffusion gegen Anti-D3-Serum und Anti-R1-Serum zeigten sich ineinander übergehende Präzipitationslinien (siehe Abb. 1 unter a) mm) am Beispiel D4-Überstand) und läßt sich mit gleichen Volumina Anti-D3-Serum oder Anti-R1-Serum ausfällen.

bb) Inaktivatoren bei rettgerocinempfindlichen Stämmen

Bisher wurden nur Inaktivatoren bei rettgerocinproduzierenden Stämmen beschrieben. Um festzustellen, ob auch rettgerocinempfindliche Stämme Inaktivatoren gegen das Rettgerocin bilden können, das sie hemmt, wurden von ihnen Kulturüberstände wie zur Rettgerocinproduktion hergestellt. Diese wurden dann auf Inaktivatoren untersucht. Dabei ließen sich folgende Inaktivierungen nachweisen bzw. ausschließen:

Tab. 8: Rettgerocininaktivatoren bei empfindlichen Stämmen

Empfindlicher Stamm	Inaktiviertes Rettgerocin
D3	R6, J5
D6 (s)[1)]	R1
D15a (s), D15b (s)	R2
D15a + b	R1, R3
D18	R1
D40a + b	R1
H27a	R6, R10, J5
H28	R6, R10, J5
J9	J5
J87	R1, J5
J5	R3
D3	R5
J5	R4

1) (s) = sehr schwacher Indikator, der nur auf angereichertes Rettgerocin empfindlich ist, daher in Tab. 1 nicht aufgeführt.

c) Die Suche nach Inaktivatoren bei jeweils rettgerocin- u n empfindlichen Stämmen führt zu folgenden Resultaten:

Tab. 9: Rettgerocininaktivatoren bei u n empfindlichen Stämmen

Unempfindlicher Stamm	Inaktiviertes Rettgerocin
D6	R1, R9
D15a	R2
H27a	J5
H28	J5

Unempfindlicher Stamm	Nicht inaktiviertes Rettgerocin bzw. Phagen
D3	R8, R9, R10, R17, R18, R19, P4, P8
D6	R2, R3
D15a + b	J5
D18	J J5
D40a + b	J5, R8
E7	R1
E12	J5
H9	R1
H24	R1
J5	R6, R17
J9	R1

IV. Diskussion

1. Stabilität der Hemmsubstanzen

Die in dieser Arbeit untersuchten Rettgerocine und Phagen waren zuerst auf festem Nährmedium gefunden worden.[8)] Dabei erfolgte der Nachweis der Hemmsubstanz unmittelbar nach deren Bildung. Außerdem bestand aufgrund der Diffusion des Rettgerocins in die Agargrundschicht eine räumliche Trennung zwischen Hemmstoff und Producerbakterien. Daraus folgt, daß diese Methode auch Hemmsubstanzen erfaßt, die ihre Wirkung nur über einen Zeitraum von wenigen Stunden entfalten und solche, die möglicherweise durch langsamer diffundierende Stoffwechselprodukte des Producers wieder inaktiviert werden. Letztere Hypothese könnte als Erklärung dafür dienen, daß die gut diffundierenden Rettgerocine, die H27b in festem Medium bildet, in Flüssigkulturen nicht nachweisbar sind[5)].

Die hier geprüften Rettgerocine zeigen in ihrer Stabilität im zellfreien Kulturüberstand erhebliche Unter-

schiede. Da labile Rettgerocine im allgemeinen bereits im frischen Überstand nur einen niedrigeren Titer erreichen als stabile, kann man als Ursache dieser Labilität eine geringere Widerstandsfähigkeit gegen Einflüsse des Kulturüberstands (Enzyme, Ionenzusammensetzung, pH, usw.) annehmen. Da sich die Gruppen der labilen und der stabilen Rettgerocine in anderen Eigenschaften, wie Sedimentation und serologischem Verhalten[5)] nicht deutlich unterscheiden, ist ein grundsätzlich verschiedener Aufbau unwahrscheinlich.

Auch die beiden Phagen P7 und P8 erwiesen sich als unstabil.

2. Diffusion der Hemmsubstanzen

Der hier durchgeführte Diffusionstest wird in seinen Ergebnissen von verschiedenen Variablen beeinflußt, die sich auch nach Standardisierung der Versuchsbedingungen nicht voll ausschalten lassen. Von Bedeutung sind insbesondere die Stabilität des getesteten Hemmstoffs und seine eventulle Phagennatur, die zur Vermehrung in Gegenwart des Indikatorstamms führt.

Das fehlende Diffusionsvermögen unstabiler Rettgerocine könnte auf Aktivitätsverlust unter die Grenze der Nachweisbarkeit bis zum Zeitpunkt des Indikatorauftrags zurückzuführen sein.

Dabei sollte aber nicht außer acht gelassen werden, daß die labilen Rettgerocine R11, R13, R17 und R19 tatsächlich wesentlich höhere Sedimentationskonstanten aufweisen als die anderen. Dies spricht dafür, daß diese Stoffe aufgrund ihrer Molekülgröße nicht in die Agarschi diffundieren konnten.

Bei der Diffusion von Phagen muß berücksichtigt wer

den, daß nach der Prädiffusionsphase mit dem Aufbringen des Indikatorrasens eine beträchtliche Konzentrationserhöhung der Phagenpartikel erfolgt. Die vom Wirt in einem lytischen Zyklus freigesetzten Phagen lysieren weitere Bakterienzellen und bewirken eine Lysezone im Indikatorrasen von mindestens einer Plaque-breite. So wird eine größere Diffusionsstrecke vorgetäuscht als ursprünglich vorhanden war.

Die Diffusionsstrecken der meisten Phagen liegen in derselben Größenordnung wie die der schwach diffundierenden Rettgerocine. Hier deutet sich eine morphologische Ähnlichkeit zwischen beiden Arten von Hemmstoffen an, die sich durch elektronenoptische Untersuchungen bestätigen ließ.[4)] Außerdem ist aus diesem Grund der Diffusionsversuch allein kein ausreichendes Kriterium zur Unterscheidung zwischen großmolekularen Rettgerocinen (Phagenschwanztyp) und temperenten Phagen.

Auffällig sind die großen Unterschiede in der Randschärfe bei den Hemmzonen verschiedener Rettgerocine. Zwei Komponenten dürften die Randschärfe maßgeblich beeinflussen. Eine davon ist der Konzentrationsverlauf des Rettgerocins in der Agargrundschicht. Je schneller die Konzentration mit zunehmender Entfernung vom Lochrand abnimmt - je steiler also der Gradient - umso schmaler wird der Bereich zwischen vollständiger und gänzlich aufgehobener Hemmung. So lassen sich die scharf begrenzten Hemmhöfe bei schwach diffundierenden und die unscharfen bei stark diffundierenen Rettgerocinen erklären.

Weiterhin hängt die Randschärfe des Hemmhofs von der Gleichmäßigkeit der Empfindlichkeit der Bakterien im Indikatorrasen ab. Besteht in der Empfindlichkeit eine Streuung,so resultiert ein unscharfer Hemmhofrand. Damit

ließe sich die unterschiedliche Randschärfe der Hemmhöfe bei Rettgerocinen mit gleichem Titer und gleichem Hemmhofdurchmesser erklären (z. B. R6 und R7).

Der scharfe Rand, der sich nach Diffusion von E12-Überstand auf den meisten R4-Indikatoren zeigte, wurde wahrscheinlich durch das hier gleichzeitig wirksame R5 hervorgerufen.

3. Sedimentationsverhalten und Molekulargewichte der Hemmsubstanzen

Durch die Ultrazentrifugation im Saccharosegradienten wurde das Sedimentationsverhalten der untersuchten Hemmsubstanzen bestimmt. Da sich mehrere Rettgerocine aus unserem Material elektronenoptisch als globuläre Partikel zeigten, konnten wir aus dem Sedimentationsverhalten näherungsweise das Molekulargewicht berechnen. Dabei ergab sich, daß die Mehrzahl unserer Hemmsubstanzen fast identische Molekulargewichte aufwies. Dieses Ergebnis macht es notwendig, noch einmal auf charakteristische Unterschiede zwischen den hier untersuchten Rettgerocinen hinzuweisen.

Die Einteilung der Rettgerocine in Gruppen (R1 bis R19) erfolgte nach ihrem Indikatorspektrum. Die Spektren einiger Rettgerocine überlappen sich zwar, sind aber doch deutlich voneinander abzugrenzen. Auch in ihrem Diffusionsverhalten sind Rettgerocine mit sehr ähnlichem Molekulargewicht deutlich verschieden (z. B. R1 und R6). Es wurde bereits gezeigt,[5)] daß sich Rettgerocine auch serologisch unterscheiden lassen. Es ist also sicherlich verfehlt, die Rettgerocine mit ähnlichem oder gleichem Molekulargewicht trotz morphologischer Ähnlichkeit als identisch anzusprechen.

Von den Molekulargewichten her gehören die Rettgerocine außer R4 zu den schwersten bisher bekanntgewordenen

Bakteriozinen.[7,12,17] Viele dieser schweren Bakteriozine haben sich bei elektronenoptischen Untersuchungen als defekte Phagen mit Phagenschwanzstrukturen erwiesen.[19,21] Drei der hier beschriebenen Rettgerocine (R1, R6, J5), die alle der Molekulargewichtsklasse von etwa 2×10^7 angehören, zeigten elektronenoptisch Phagenschwanzaussehen [4]. Demnach könnte es sich bei den Rettgerocinen, die im Saccharosegradienten ähnlich liefen wie die drei oben genannten, ebenfalls um Phagenschwänze handeln.

In vielen Fällen ergab die Gradientenzentrifugation Aufschluß über Anzahl und Art der Hemmsubstanzen eines Producerstamms. So fanden sich bei den Producern D34, E12, D8b, D40b und D26b Hemmstoffmaxima gegen verschiedene Indikatoren in verschiedenen Fraktionen derselben Gradienten. Daraus folgt, daß mehr als eine Hemmsubstanz gebildet wurde. Diese Hemmsubstanzen wurden dann auch verschieden bezeichnet (Tab. 1). Bei D34 konnten R2 und P6 unterschieden werden, die beide J87 hemmen. Bei den übrigen obengenannten Producern lagen verschiedene Rettgerocine mit unterschiedlichem Hemmuster vor.

Bei R2 und R18, wo zwei Peaks auf demselben Indikator auftraten, von denen einer am Boden des Gradienten lag, nahmen wir nur ein Bakteriozin an. Da in den Fraktionen am Gradientenboden auch beim Ausverdünnen niemals Phagenplaques auftraten, liegt das Rettgerocin wahrscheinlich zum Teil in großen Aggregaten vor und ist dann entsprechend schwerer. Bei R2 konnte der zweite Peak am Röhrchenboden auf dem Indikator J87 nicht nachgewiesen werden, da der in diesen Fraktionen ebenfalls vorhandene Phage P6 den Stamm J87 lysiert. Aus dieser Beobachtung kann daher nicht auf die Bildung eines weiteren Rettgerocins durch den Producer D34 geschlossen werden.

Besondere Beachtung verdient das von E12 gebildete

R4. Sein Molekulargewicht ist erheblich niedriger als das der übrigen hier beschriebenen Rettgerocine und konnte daher durch die von uns angewandte Gradientenzentrifugation nicht bestimmt werden. Seine Haltbarkeit entspricht der der stabilsten schweren Rettgerocine. Da es durch Trypsin inaktiviert wird[8], ist es sicherlich ein Protein. Es zeigt keine serologische Verwandtschaft zu den Phagenschwanzrettgerocinen[5]. Hier ist also zum ersten Mal ein Rettgerocin gefunden worden, das keine Beziehung zu temperenten Phagen aufweist, sondern in seinen bisher bekannten Eigenschaften eher den Colicinen ähnlich ist[12]. Interessant ist jedoch, daß das Indikatorspektrum von R4 sich mit dem des ebenfalls von E12 gebildeten schweren R5 überschneidet, mit dem es sonst keine Ähnlichkeit hat. Möglicherweise können also völlig verschiedene Rettgerocine am selben Rezeptor angreifen, oder die betreffenden Indikatoren verfügen über mehrere Rezeptortypen.

4. Eigenschaften der Rettgerocininaktivatoren

a) Bildung

Der Inaktivator, der D3 gegen das Rettgerocin J5 bilde wurde zufällig im Überstand einer mitomycininduzierten Kultur gefunden. Er konnte aber auch in nichtinduzierten Kulturen im flüssigen wie auf festem Medium nachgewiesen werden. Wachsende Kulturen geben diese Substanz demnach in wechselnder Menge an die Umgebung ab. Aus der Kinetik der Inaktivatorabgabe läßt sich ablesen, daß um so mehr von dieser Substanz frei wird, je mehr die Keime in der Kultur durch Mitomycin C oder Lysevorgänge am Beginn der stationären Phase geschädigt werden. Das weist darauf hin, daß Inaktivator besonders beim Zerfall von Zellen frei wird. Diese Vermutung wird auch gestützt durch den Nachweis von

Inaktivator in einer O-Antigenpräparation von D3 (5.1.12). Da hier die Zellen zweimal in 0,9 % NaCl gewaschen worden waren, enthielt die Präparation keinen Kulturüberstand mehr.Der Inaktivator muß also beim Kochen aus angegriffenen oder zerstörten Zellen frei geworden sein.

b) Physikalische und chemische Charakterisierung der Inaktivatoren

Im Saccharosegradienten lag das Maximum des Inaktivators im selben Bereich wie das der schweren Rettgerocine. Das entspricht einem Molekulargewicht von 2 bis 5 x 10^7 Dalton. Der breite Peak im Gradienten deutet an, daß die Molekülgröße nicht einheitlich ist. Nach Phenolbehandlung sedimentiert der Inaktivator geringfügig schneller, zugleich erhöht sich die rettgerocininaktivierende Wirkung.

Ebenso wie Phenol bewirkt auch Trypsin eine Aktivitätszunahme auf das Zehnfache. Hieraus kann man schließen, daß der Inaktivator selbst kein Protein ist. Die Aktivitätszunahme deutet jedoch darauf hin, daß seine Wirkung durch die Anwesenheit von Proteinen im Kulturüberstand oder an ihm selbst beeinträchtigt wird.

In 1 %-iger SDS-Lösung verliert der Inaktivator - ganz im Gegensatz zum Rettgerocin R1 - 99 % seiner Aktivität. Der Inaktivator hat demnach Polysaccharid- oder Lipopolysaccharidnatur.

c) Serologische Charakterisierung

Weitere Hinweise auf die Natur des Inaktivators erbrachte die serologische Analyse. Im Agardiffusionstest nach Ouchterlony wurde er sowohl von Anti-R1-Serum

als auch vom Anti-O-Serum gegen D3 präzipitiert. Da die gereinigte R1-Präparation, mit der das Anti-Rettgerocinserum hergestellt war, Inaktivator enthielt[5], reichte dieses Ergebnis nicht zur Annahme einer Kreuzreaktion zwischen Inaktivator und Rettgerocin aus. Das Serum konnte ja auch Antikörper gegen den Inaktivator enthalten. Präabsorbierte man das Anti-R1-Serum nun vollständig mit D3-O-Antigen und entfernte die Präzipitate durch Abzentrifugieren, so behielt es seine Neutralisationsfähigkeit gegenüber R1.[5] Der Inaktivator wurde jedoch nicht mehr präzipitiert. Dieses Serum enthielt also Antikörper sowohl gegen Rettgerocin als auch gegen Inaktivator und zwischen diesen beiden Stoffen besteht keine serologische Verwandtschaft. Gleichzeitig wurde durch diesen Versuch gezeigt, daß der Antikörper gegen Inaktivator durch O-Antigen fällbar ist. Das beweist eine serologische Kreuzreaktion zwischen O-Antigen und Inaktivator.

d) Biologische Charakterisierung

Aus den Erkenntnissen über Bildung, physikalische, chemische und serologische Eigenschaften des Inaktivators folgt, daß es sich hier um einen hochmolekularen Zellwandbestandteil aus der O-Antigenfraktion handelt. Da die Lipopolysaccharide der Zellwand häufig als Rezeptoren für Phagen und auch für manche Bakteriocine dienen,[10] nahmen wir an, daß der von uns gefundene Inaktivator ein in löslicher Form aus Kulturmedium abgegebener Rettgerocinrezeptor ist. Für diese Vermutung ergaben sich experimentell weitere Hinweise. Zum ersten ist die Inaktivierung spezifisch, das heißt, der Inaktivator inaktiviert nur bestimmte Rettgerocine. Andere mit ähnlicher Sedimentationskonstante wie J5, so zum Beispiel R5, beeinflußt er in ihrer Aktivität nicht. Zum zweiten fanden sich Inak-

tivatoren besonders häufig bei Stämmen, die empfindlich für das jeweils inaktiverte Rettgerocin sind und folglich Rezeptoren dafür haben müssen. Die beobachteten Ausnahmen von dieser Regel erklären sich damit, daß einerseits Nichtindikatoren noch Rezeptoren bilden, aber aus anderen Gründen dem Rettgerocin gegenüber tolerant geworden sind, und daß andererseits Indikatoren, was ja eigentlich der Normalfall ist, ihre Rezeptoren nicht in die Umgebung freisetzen. Da D3 als Indikator zwar J5 inaktiviert, nicht aber R5, liegen hier wenigstens zwei verschiedene Rettgerocinrezeptoren in der Zellwand vor, von denen nur einer als Inaktivator frei wird. Ebenso inaktiviert J5 als Indikator zwar R3, nicht aber R4.

e) Wirkungsweise des Inaktivators

Die Bindung des Inaktivators an das Rettgerocin erfolgt innerhalb weniger Sekunden. Sie ist jedoch nicht irreversibel. Ein Antikörper gegen den Inaktivator, dessen Affinität offenbar höher ist, vermag sie wieder vollständig zu lösen. Da das Rettgerocin hiernach wieder voll aktiv ist, kann es in seinem Aufbau durch den Inaktivator nicht irreversibel verändert worden sein.

Die Bindung des Antikörpers an den Inaktivator-Rettgerocin-Komplex setzt das Rettgerocin wieder frei. Der Mechanismus(Konformationsänderung an der Bindungsstelle des Inaktivators, sterische Behinderung der Bindung oder identische Bindungsstellen für Antikörper und Rettgerocin am Inaktivator) bleibt ungeklärt.

f) Inaktivatoren gegen Bakteriozine anderer Arten

Verschiedene Autoren berichteten bisher über die bakteriozininaktivierende Wirkung bakterieller Lipopoly-

saccharide.[9, 14,18,23)] Uns ist aber nur ein Bericht über einen spontan gebildeten Inaktivator, und zwar gegen Colicin B, bekannt.[11)] Dieser Inaktivator verhielt sich nach Filtrierbarkeit, Dialysierbarkeit, Hitzestabilität und Trypsinempfindlichkeit wie der von uns untersuchte. In bezug auf das Vorkommen bestanden jedoch Unterschiede. Der Colicin B Inaktivator wurde nur von Stämmen gebildet, die resistent gegen Colicin B waren. Es wurden weder empfindliche Stämme mit, noch resistente Stämme ohne Inaktivatorbildung gefunden.

Obwohl also aus Bakterienzellen extrahiertes Lipopolysaccharid häufig Bakteriozine inaktiviert, werden solche Stoffe nur äußerst selten als lösliche Inaktivatoren in Kulturüberständen gefunden. Das von uns untersuchte Stammkollektiv von Proteus rettgeri stellt hier eine Ausnahme dar.

Zusammenfassung

19 Bakteriozine und neun Bakteriophagen von 53 Isolaten der Spezies Proteus rettgeri wurden mit biologischen, biochemischen und biophysikalischen Methoden charakterisiert. Die Hemmstoffe zeigten folgende Eigenschaften:

1. Neun Rettgerocine (ca. 50 %) und sieben Phagen (ca. 80 %) waren in Kulturüberständen stabil.
2. Neun Rettgerocine (ca. 50 %) zeigten Diffusionsvermögen in Agar.
3. Das Sedimentationsverhalten in Saccharosegradienten entspricht bei 13 Rettgerocinen einem Molekulargewicht von 2 bis 5 x 10^7 und liegt damit in der Größenordnung von Phagenschwänzen. Zwei sind wesentlich kleiner und vier schwerer als die übrigen.
4. In einem Teil der Kulturüberstände wurden erstmals Substanzen gefunden, die Rettgerocine anderer Stämme spezifisch inaktivieren.
5. Einer dieser Inaktivatoren wurde biologisch, biochemisch und biophysikalisch charakterisiert. Es handelt sich um ein Zellwandlipopolysaccharid mit einem inhomogenen Molekulargewicht von 10^8D, das serologisch mit dem O-Antigen des erzeugenden Stammes kreuzreagiert. Die Inaktivierung läuft in 20 Sekunden vollständig ab und ist nach Zugabe von Anti-O-Serum voll reversibel.

Die Rettgerocine gehören damit - anders als die Colicine - zu den Bakteriozinen vom Phagenschwanztyp und ähneln in ihren Eigenschaften den von Pseudomonas aeruginosa gebildeten Pyocinen.

Schrifttum

1. Bauernfeind, A.: Kreuzinfektionen der Harnwege durch einen neuen Typ von Proteus rettgeri; Habilitationsschrift von der Ludwig-Maximilians-Universität München (1973).
2. Bauernfeind, A., G. Wiersma: Nosokomiale Infektionen des Harnsystems mit Proteus rettgeri. Immunität und Infektion 4, 138-141 (1977).
3. Bauernfeind, A., C. Petermüller und R. Schneider: Bacteriocins as Tools in Analysis of Nosokomial Klebsiella pneumoniae Infections. J. Clin. Microbiol. 14: 15-19 (1981).
4. Bauernfeind, A.: Unveröffentlichte Ergebnisse.
5. Baumgarten, H.: Klassifizierung von Bakteriozinen bei Proteus rettgeri und ihre Verwendbarkeit zur Stammtypisierung. Inauguraldissertation, Ludwig-Maximilians-Universität München (1981).
6. Bennet, J.V., P.S. Brachman: Hospital Infections. Little Brown and Company, Boston (1979).
7. Brandis, H., J. Šmarda: Bacteriocine und bacteriocinähnliche Substanzen. Fischer Verlag Jena (1971).
8. Camissar, G.: Antimikrobielle Hemmstoffe bei Proteus rettgeri. Inauguraldissertation, Ludwig-Maximilians-Universität München (1977).
9. Chang, J.Y., L.P. Hager: Inhibition of Colicin E2 Activity by Bacterial Lipopolysaccharide. J. Bacteriol. 104: 1106-1109 (1970).
10. Costerton, J.W., J.M. Ingram and K.J. Cheng: Structure and Function of the Cell Envelope of Gram Negative Bacteria. Bacteriol. Rev. 38, 87-119 (1974).
11. Guterman, S.K., S.E. Luria: Escherichia coli: Strains That Excrete an Inhibitor of Colicin B. Science 164, 1414 (1970).
12. Hardy, K.G.: Colicinogeny and Related Phenomena. Bacteriol. Rev. 39, 464-515 (1976).
13. Hellinger, B.: Ein neuer Weg zur Typisierung von Proteus rettgeri. Inauguraldissertation, Ludwig-Maximilians-Universität München (1977).
14. Koval, S.F., P.M. Meadow: The Isolation and Characterization of Lipopolysaccharide-defective Mutants of Pseudomonas PAC1. J. Gen. Microbiol. 98, 387-398 (1977).

15. Namioka, S. und R. Sakazaki: Etude sur les Rettgerella. Annales de l'Institut Pasteur 94, (1958).

16. Parker, M.T.: Hospital-acquired Infections: Guidelines to Laboratory Methods. World Health Organization, Regional Office for Europe, Copenhagen (1978).

17. Reeves, P.: The Bacteriocins, Springer Verlag Berlin, Heidelberg, New York (1972).

18. Sabet, S.F., C.A. Schnaitman: Localization and Solubilization of Colicin Receptors. J. Bacteriol. 105, 422-430 (1971).

19. Tagg, J.R., A.S. Dajani und L.W. Wannamaker: Bacteriocins of Gram-Positive Bacteria. Bacteriol. Rev. 40, 722-756 (1976).

20. Traub, W.H., J. Kleber: Induction of Bacteriocins (Phage Tails) of Proteus rettgeri with Trimethoprin. Experientia 30, 494-495 (1974).

21. Traub, W.H., G. Acker und J. Kleber: Studies on Phage Tail Bacteriocins of Proteus rettgeri, Zbl. Bakt. Hyg. 1. Abt. Orig. A229, 362-371 (1974).

22. Weir, D.M.: Handbook of Experimental Immunology, Verlag Blackwell, Oxford and Edinburgh, 2nd Ed. (1973).

23. Weltzien, H.V., M.A. Jasaitis: The Nature of the Colicin K Receptor of Escherichia coli Cullen. J. Exp. Med. 133, 534-553 (1971).

Lebenslauf

Am 17. Juli 1954 wurde ich als Sohn des Arztes Dr. Fritz Baumgarten und seiner Ehefrau Irmgard in München geboren.

Nach Schulbesuch in Fürth, Füssen und Hohenschwangau bestand ich 1973 das Abitur. Vom Wintersemester 1973 bis zum Sommersemester 1979 studierte ich Medizin an der Universität Würzburg, der Technischen Universität München und der Universität München. Am 15. November 1979 bestand ich in München die Ärztliche Prüfung und erhielt am 26. November 1979 die Ärztliche Approbation.

Seit 1. Januar 1980 arbeite ich an der Medizinischen Poliklinik der Universität München als angestellter Arzt auf dem Gebiet der experimentellen Krebsforschung.